Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. K. Botzenhart
Abteilung Mikrobiologie
Abteilungsleiter: Professor Dr. med. K. Botzenhart

NACHWEIS VON IMMUNKOMPLEXEN IM SPUTUM VON PATIENTEN MIT CYSTISCHER FIBROSE UND CHRONISCHER PSEUDOMONAS, AERUGINOSA-LUNGENINFEKTION SOWIE AUFSPALTUNG DIESER IMMUN-KOMPLEXE UND ANTIGENIDENTIFIZIERUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Verena Luise Buhl-Meyer geb. Buhl
aus Meßkirch

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547620_0061

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. K. Botzenhart
Abteilung Mikrobiologie
Abteilungsleiter: Professor Dr. med. K. Botzenhart

NACHWEIS VON IMMUNKOMPLEXEN IM SPUTUM VON PATIENTEN MIT CYSTISCHER FIBROSE UND CHRONISCHER PSEUDOMONAS, AERUGINOSA-LUNGENINFEKTION SOWIE AUFSPALTUNG DIESER IMMUN-KOMPLEXE UND ANTIGENIDENTIFIZIERUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Verena Luise Buhl-Meyer geb. Buhl
aus Meßkirch

1984

Dekan:	Professor Dr. med. G. Fichtner
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. K. Botzenhart
2. Berichterstatter:	Professor Dr. med. R. Haasis

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

FÜR DIETER

Die vorliegende Arbeit wurde am Hygiene-Institut, Lehrbereich Medizin, unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. Botzenhart, Hygiene-Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Für das Überlassen des Themas danke ich Herrn Prof. Dr. K. Botzenhart.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Döring für die ständige Betreuung während der Arbeit.

Herrn Dr. Ziegler und Frau A. Schenk sei an dieser Stelle für die Unterstützung beim Rajizelltest gedankt.

Daneben danke ich allen Mitarbeitern des Hygiene-Instituts, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	7
2.1 Reagenzien und Chemikalien	7
2.2 Patienten, Sera und Sputa	8
2.2.1 Solubilisierung der Sputa	9
2.3 Raji-Zellen	9
2.3.1 Wachstumsbedingungen	9
2.3.2 Einstellung der Zellzahl	10
2.3.3 Bestimmung der Lebensfähigkeit der Zellen	10
2.4 Herstellung von aggregiertem menschlichen IgG (AHG)	11
2.4.1 Proteinbestimmung	12
2.5 Rajizelltest	12
2.5.1 Prinzip des Rajizelltests	13
2.5.2 Durchführung	15
2.5.3 Kontrollversuche	16
2.6 Isolierung der Immunkomplexe	16
2.7 Behandlung der Immunkomplexe mit 2-Mercaptoethanol und Jodacetamid	17
2.7.1 Durchführung	17
2.7.2 Prinzip der reduktiven Spaltung	18
2.7.3 Kontrollversuche	20
2.8 Radioimmunoassays zum Antigen- und Antikörpernachweis	20
2.8.1 Bestimmung der Proteasenkonzentration	21
2.8.2 Bestimmung des Antikörpergehaltes	22

Seite

3. ERGEBNISSE 24
3.1 Nachweis von Immunkomplexen in Sputa und Sera 24
3.2 Aufspaltung der Immunkomplexe 25
3.2.1 Immunkomplex-Isolierung 25
3.2.2 Bestimmung der Proteasenkonzentration 27
3.3 Bestimmung der Antikörpertiter gegen die alkalische Protease und die Elastase 27
3.4 Kontrollversuche 29
4. DISKUSSION 31
5. ZUSAMMENFASSUNG 36
Literaturverzeichnis 38

Abkürzungen

SAS = saturated ammonium sulfate

PBS = phosphate-buffered saline

2-ME = 2-mercaptoethanol

cpm = counts per minute

RIA = radioimmunoassay

NSB = nonspecific binding

C = complement

MEM = minimal essential medium

BSA = bovine serum albumine

FCS = fetal calf serum

IC = immune complexes

CIC = circulating immune complexes

CF = cystic fibrosis

SLE = systemic lupus erythematosus

PEG = polyethylene gylcol

1. EINLEITUNG

Immunkomplexe (IC) spielen für Auslösung und Verlauf einer Vielzahl von Erkrankungen eine bedeutsame, wenngleich unterschiedliche Rolle (1). Man hat Immunkomplexe im Serum (CIC) und vereinzelt IC-Ablagerungen in den Geweben u.a. entdeckt bei bakteriellen (z. B. Lepra, Meningitis, infektiöse Endokarditis), Virus- (z. B. Virus-Hepatitis, subakute sklerosierende Panencephalitis) oder Parasiteninfektionen (z. B. Malaria), bei Fällen mit neoplastischen Erkrankungen und bei Autoimmunkrankheiten wie z. B. rheumatoider Arthritis oder Lupus erythematodes (SLE).

Die Tatsache, daß IC im Zusammenhang mit derlei unterschiedlichen klinischen Bedingungen in Erscheinung treten, deutet auf ihre Heterogenität hin, und tatsächlich wurden bei verschiedenen Krankheiten erhebliche Differenzen festgestellt bezüglich Immunglobulinklasse, Fähigkeit zur Komplementaktivierung oder Größe der Immunkomplexe (2); und als Resultat davon müssen die damit verbundenen unterschiedlichen pathologischen Konsequenzen gesehen werden, ebenso wie die Vielfältigkeit der in den letzten Jahren entwickelten IC-Nachweismethoden (3).

Die Fähigkeit von Immunkomplexen, sich an Gefäßwänden und Glomerula der Niere abzulagern, kann eine klinisch und histologisch nachweisbare Vaskulitis und/oder Glomerulonephritis auslösen (4, 5). Dies wurde im Tierexperiment bewiesen (6), und die Erkenntnisse waren sehr wohl auf den Menschen übertragbar.

Beim SLE haben klinische Studien (7, 8, 9, 10) schwere Gewebsläsionen bei mehreren Organen einschließlich Nieren, Gehirn und Blutgefäße nachgewiesen und weiter aufgezeigt, daß diese Läsionen von IC-Besiedlungen der betroffenen Organe begleitet sind. Man nimmt an, daß es sich um DNS/anti-DNS-Antikörper-IC handelt, die mit den SLE-Symptomen in Beziehung stehen.

Neben endogenen (z. B. bei Autoimmunkrankheiten) werden exogene (z. B. bei chronischen Verlaufsformen von Infektionskrankheiten) Faktoren für die pathogenen Immunreaktionen mit dem Ergebnis, daß sich CIC im Gewebe absetzen, verantwortlich gemacht; jedoch konnten in den meisten Fällen bis heute nur Vermutungen über das kausale Antigen geäußert werden, da sich der direkte Nachweis als äußerst schwierig erwiesen hat.

Eine Krankheit, bei der bereits des öfteren IC im Serum (11 - 17) sowie in einem Fall IC-Depots in mehreren Organen (18) aufgezeigt wurden, während die ursächlichen patho-physiologischen Zusammenhänge unbekannt geblieben sind, ist die cystische Fibrose (CF).

Die CF ist eine erbliche Stoffwechselanomalie der weißen Rasse mit Häufigkeit 1:2000 bei Neugeborenen, charakterisiert durch verstärkte Schleimsekretion der mukoiden Drüsen sowie erhöhten Schweißelektrolytgehalt (19). Das Schleimdrüsensekret ist bei CF-Patienten visköser als bei Gesunden, was zur Insuffizienz der Lunge und der Verdauungsorgane führen kann, außerdem ist es mit seinem hohen Glykoprotein- und Proteingehalt ein guter Nährboden für Bakterien. So kommt es bei dieser Krankheit häufig (70 - 90 %) zu Überlagerungen von schweren eitrigen Pulmonalinfektionen.

Bakterien wie Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa) sind, neben Staphylococcus aureus, Hämophilus influenzae und Diplococcus pneumoniae, die Hauptverantwortlichen für solche immer wieder aufflammende Infektionen.

Da sich eine medikamentöse Behandlung bisher als nicht ausreichend erwiesen hat (20, 21), stehen die Prognosen für CF-Patienten mit chronischer P. aeruginosa-Lungeninfektion sehr schlecht; und selbst bei frühzeitiger Erkennung und Behandlung, welche vor allem in der regelmäßigen Entfernung des zähen Schleims aus Atemwegen und Verdauungsorganen besteht, ist die Lebenserwartung für diese Menschen

niedrig; mehr als 50 % der Patienten sterben vor Erreichen des 21. Lebensjahres (22).

Die Virulenz des P. aeruginosa-Organismus wird in erster Linie den extrazellulären Enzymen und Toxinen zugeschrieben (23, 24); Exotoxin A, die alkalische Protease (AP) und die Elastase (Ela) sowie eine Anzahl nicht identifizierter Antigene gehören dazu. Speziell der AP und Ela wird die Verantwortung für Gewebsläsionen und Zerstörung körpereigener wichtiger Proteine angelastet (25 - 29).

Inwieweit jedoch bei CF mit P. aeruginosa-Infektion des Respirationstraktes die pathogenen Mechanismen direkt zu Lasten des Bakteriums gehen, oder ob eine Immunantwort auf die Bakterienpathogene, die zu IC-Bildung führen kann, eine Rolle spielt, oder inwieweit sie auf dem zugrundeliegenden Defekt durch die Erbkrankheit beruhen, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden.

Der Nachweis der AP und Ela im Bronchialsekret von Patienten mit CF und P. aeruginosa-Lungeninfektion gelang erst vor kurzem mittels zweier hochempfindlicher Radioimmunoassays (30). Das Vorhandensein der Enzyme korrelierte mit dem Fehlen von spezifischen humoralen Antikörpern gegen diese Enzyme. Nach Einsetzen der Immunantwort auf die Proteasen konnten keine freien Proteasen mehr nachgewiesen werden.

Dies könnte zu der Vorstellung führen, daß die beiden Proteasen nur zu Beginn der P. aeruginosa-Infektion von Bedeutung sind.

In einer Longitudinalstudie (31) war bei der Mehrzahl der Patienten ein Anstieg der Antikörperwerte gegen die AP und Ela zu verzeichnen, und das bei gleichzeitiger Verschlechterung des klinischen Zustandes.

Aus diesem Ergebnis könnte man folgern, daß trotz hoher Antikörpertiter ständig Proteasen gebildet werden und daß, da keine Proteasen direkt nachweisbar sind, eine permanente Immunkomplex-Bildung im Respirationstrakt stattfindet.

In der bis jetzt einzigen Untersuchung hierüber hat Schiøtz (32) bei CF-Patienten mit chronischer P. aeruginosa-Infektion eine weit höhere IC-Aktivität im Sputum festgestellt als bei CF-Patienten ohne P. aeruginosa-Infektion; und er spricht in diesem Zusammenhang von einer in-situ-Bildung von IC in der Lunge.

Eine weitere Folgerung aus diesen Erkenntnissen könnte sein, daß sich die proteolytische Aktivität der Enzyme auf die Anfangsphase der chronischen P. aeruginosa-Lungeninfektion beschränkt, während die in der Folgezeit auftretenden Schäden in den Alveolen und Respirationspassagen teilweise zu Lasten der IC gehen, analog zu einer Arthus-Reaktion.

Bei dieser Immunkomplex-vermittelten Überempfindlichkeit kann über eine Folge von neben- und nacheinander auflaufenden Vorgängen eine akute Entzündungsreaktion im Organismus ausgelöst werden; das Komplementsystem wird aktiviert, polymorphkernige Leukozyten setzen proteolytische Fermente am Entzündungsgebiet frei; daneben kommt es zur Histaminfreisetzung, und über die Aggregation von Thrombozyten können zusätzlich Mikrothromben gebildet und vasoaktive Amine ausgeschüttet werden. Der ganze Mechanismus hat letztendlich die Zerstörung körpereigenen Gewebes durch körpereigene proteolytische Enzyme zur Folge. Diese Immunreaktion ist auch für andere chronische Infektionen beschrieben worden (33).

Es gibt eine Reihe von Autoren, die fordert, daß die IC-Bildung bei der cystischen Fibrose als verstärkender Mechanismus in der Schädigung von anfälligem Gewebe inner-

halb der Lunge und des Respirationstraktes agiert, während der zugrundeliegende Defekt von den abnormalen Sekretionen bei dieser Krankheit herrührt (12, 13, 14, 32, 34, 35). Man beruft sich hierbei auf die positiven IC-Nachweise im Serum von CF-Patienten, auf den Nachweis von IC- und Immunglobulinablagerungen im Gewebe (11, 18, 35), sowie auf eine bei der cystischen Fibrose vielfach festgestellte Hypergammaglobulinämie (36, 37), welche für IC-Krankheiten charakteristisch ist.

In dem Punkt jedoch, welche Beziehung zwischen P. aeruginosa-Antigenen und den CIC besteht, gehen die Meinungen weit auseinander.

Dies liegt sicher in erster Linie daran, daß es bis heute unmöglich war, die im Serum nachgewiesenen Immunkomplexe exakt zu charakterisieren; d.h. den direkten Beweis zu erbringen, daß es sich bei den an der IC-Bildung beteiligten Antigenen tatsächlich um Pseudomonastoxine handelt.

In wenigen Fällen konnte ein Antikörperspezifität gegen P. aeruginosa-Lipopolysaccharide aufgezeigt werden (12, 15, 16).

Andere Autoren hingegen konnten aufgrund ihrer Untersuchungen lediglich Rückschlüsse auf eine P. aeruginosa-Antigenbeteiligung ziehen (11, 32, 38). CF-Patienten mit P. aeruginosa-Infektion wiesen höhere IC-Werte im Serum auf als solche ohne P. aeruginosa-Infektion (11). P. aeruginosa-infizierte CF-Patienten mit akuten Exazerbationen hatten höhere IC-Werte als solche mit klinisch unverändertem Krankheitsbild (15).

Church (13) hat in seiner Arbeit keinerlei Zusammenhang zwischen Lungenfunktion, Serum-IC bzw. Immunglobulinkonzentration und P. aeruginosa-Infektion gesehen, und er geht so weit, den CIC jegliche Bedeutung für die cystische

Fibrose abzusprechen; ähnlich Manthei (12), der den Schluß zieht, daß P. aeruginosa-Antigene bei der Immunkomplex-Bildung eine, wenn überhaupt, untergeordnete Rolle spielen.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun zum einen überprüft werden, welchen Stellenwert die Immunkomplexe bei der cystischen Fibrose mit chronischer P. aeruginosa-Infektion einnehmen; hierfür sollten die Sputa und Sera solcher Patienten auf Immunkomplexe untersucht werden. Zum anderen sollten mit einer speziellen Spaltungsmethode die Immunkomplexe aufgetrennt und durch einen direkten Nachweis des Antigens mittels Radioimmunoassays der Beweis erbracht werden, daß es sich bei den an der IC-Bildung beteiligten Antigenen um P. aeruginosa-Enzyme handelt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Reagenzien und Chemikalien

von Behringwerke AG, Marburg/Lahn:
Rinderserum-Albumin
Meerschweinchen-Komplement, lyophilisiert

von Dynatech Deutschland GmbH, Plochingen:
Flexible Mikrotiter-U-Platten

von Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg:
Protein A-Sepharose CL-4B

von Böhringer, Mannheim:
Dulbecco's 1 x Medium

von Falcon Plastics, Heidelberg:
PVC-Microtiterplatten
Gewebekulturflaschen

von Flow Laboratories, Bonn:
Fetales Rinderserum, hitzeinaktiviert
anti human IgG

von Merck-Schuchardt, Hohenbrunn:
2-Mercaptoethanol

von Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg:
Visking-Dialysierschläuche
Jodacetamid
Penicillin-Streptomycin
L-Glutamin
Trypanblau

von Amersham Buchler GmbH, Braunschweig:
$Na^{125}J$, trägerfrei

von Sigma GmbH, München:
Dithiothreitol

Nicht aufgeführte Substanzen wurden in analysenreiner Qualität von der Firma E. Merck AG, Darmstadt bezogen.

Die Jodierung von anti human IgG wurde freundlicherweise von Herrn Dr. G. Döring durchgeführt.

2.2. Patienten, Sera und Sputa

Zur Bestimmung von IC, sowie für den Nachweis von Antikörper- und Proteasenkonzentrationen waren Sputum- und Serumproben von 12 CF-Patienten, 6 weiblichen und 6 männlichen im Alter zwischen 4 und 27 Jahren, aus der CF-Klinik TG, Rigshospitalet, Kopenhagen, Dänemark zur Verfügung gestellt worden. Von allen Patienten bzw. Eltern hatte man zuvor eine Einverständniserklärung erhalten.

Die Diagnose cystische Fibrose beruhte auf allgemein anerkannten Kriterien (19), beinhaltend eine typische Krankheitsgeschichte mit deutlich erhöhtem Schweißelektrolytgehalt in wiederholt durchgeführten Tests sowie veränderter Lungenfunktion.

Alle Patienten litten an chronischer Pseudomonas aeruginosa-Lungeninfektion, wobei der Beginn der chronischen P. aeruginosa-Infektion definiert wurde als der Zeitpunkt, von dem an in jeder Sputumprobe über mindestens 6 Monate hinweg Pseudomonas aeruginosa gefunden wurde (34).

Die Sera und solubilisierten Sputa (s. 2.2.1.) wurden bei - 20°C eingefroren.

2.2.1. Solubilisierung der Sputa

Um den zähen Schleim untersuchen und bearbeiten zu können, war eine Solubilisierung notwendig, dies erfolgte in Anlehnung an die Methode von Hammerschlag (39).

Die Sputa wurden zu gleichen Teilen mit einer sterilen Verdünnung von Dithiothreitol (DDT) in PBS (pH 7,2) so vermischt, daß eine Endkonzentration von 50 µg DTT/ml PBS erhalten wurde. Das Gemisch wurde 10 Minuten auf einem Vortex-Mixer homogenisiert, anschließend bei 8000 g 10 Minuten lang zentrifugiert; der Überstand wurde abpipettiert und eingefroren bei -20°C, das Pellet verworfen.

2.3. Raji-Zellen

Raji-Zellen zum Nachweis von Immunkomplexen in den Sera und Sputa wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Ziegler, Medizinische Klinik, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

Raji-Zellen sind menschliche Lymphoblastoide mit B-Zellcharakteristik aus dem Burkitt-Lymphom, einem durch das Epstein-Barr-Virus induzierten Tumor.

2.3.1. Wachstumsbedingungen

Die empfindlichen Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank unter Verwendung von speziellem Medium in Falcon-Plastikflaschen gezüchtet und jeden 1. bis 2. Tag überimpft, da sie sich rasch vermehren. Beim Überimpfen wurde jeweils die Hälfte einer Zellkultur der Falconflasche entnommen und durch vorgewärmtes Medium zu gleichen Teilen ersetzt bzw. ergänzt.

Es wurden stets Falconflaschen derselben Größe (50 ml) verwendet; größere Gefäße hätten eine CO_2-Begasung beim Abfüllen erfordert, da die Zellkulturen in alkalischem Milieu zugrunde gehen.

Zusammensetzung des Mediums:
als Grundlage für das 10 %-FCS-Medium diente das von der Firma Böhringer bezogene MEM Dulbecco (500 ml), mit $NaHCO_3$, 4,5 g/l Glucose, ohne Glutamin.
Diesem wurden unter sterilen Bedingungen zugesetzt:

Penicillin (100 000 E) + Streptomycin (100 000 µg)	10 ml
L-Glutamin (20 mMol)	5 ml
Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert 30 Min./ 56 °C	50 ml

Die Haltbarkeit einer solchen Mischung ist auf ca. 2 Monate begrenzt.

2.3.2. Einstellung der Zellzahl

Die Zellkulturen wurden 48 Stunden nach Überimpfung 1 Min. bei 800 U (Heraeus Minifuge 2) zentrifugiert und das Ganze durch vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes konzentriert. (Bei 40 ml Ausgangslösung wurden rund 3 ml belassen).
Nach kurzem Durchmischen erfolgte die Zellzahlermittlung/ml durch Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm^2). Die beim Immunkomplex-Test verwendete Zellzahl betrug 10^7/ml Medium.

2.3.3. Bestimmung der Lebensfähigkeit der Zellen

Vor jedem Versuch wurde die Lebensfähigkeit der Zellen mittels Trypanblau getestet.

Unter dem Lichtmikroskop erscheinen die gesunden Zellen als helle, gleich große polygonale Gebilde mit homogener Struktur, viele Zellen meist traubenförmig zusammenhängend. Dunkle Verfärbung mit Sichtbarwerden von schwarzen Strukturen im Zellinnern sowie Auflösung der traubenförmigen Zellverbände deutet auf Zelltod hin; Beweis für den Zelltod ist der mikroskopisch sichtbare Einschluß von Trypanblau im Zellinnern.

Der Umgang mit den Rajizellen erforderte besondere Vorsichtsmaßnahmen (Infektionsgefahr) und erfolgte stets unter sterilen Bedingungen.

2.4. Herstellung von aggregiertem menschlichen IgG (AHG)

Aus einem Pool von 20 menschlichen Seren gesunder Erwachsener erfolgte die Reinigung der IgG-Fraktion:
aus 150 ml Serum wurden die Immunglobuline mit 30 %iger Ammoniumsulfatlösung (SAS), (ein Teil Serum und zwei Teile SAS), gefällt. Das durch Zentrifugation (8000 g/10Min./4°C) erhaltene Präzipitat wurde in 0,01 M Tris/HCl-Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde an einer DEAE-Sephacel-Säule chromatographiert. Die proteinhaltigen Fraktionen des Eluats wurden gesammelt, einer Reinheitsprüfung durch Immunelektrophorese unterzogen und anschließend ultrazentrifugiert (150 000 g/90 Min.), um eine Abtrennung von Aggregaten zu erreichen. Das obere Drittel des Überstandes, deaggregiertes oder monomeres IgG, wurde bei -70°C eingefroren, nachdem der Proteingehalt bestimmt worden war.

AHG wurde erhalten durch Erhitzen von gereinigtem monomerem IgG im Wasserbad bei 63°C, 30 Min. (40). Damit die Uniformität in der Größe der Aggregate gewährleistet war, wurde jeweils eine größere Anzahl von Proben hergestellt, und diese wurden in Fläschchen zu je 0,1 ml bei -70°C aufbewahrt. Eine Probe war einen Monat lang verwendbar, ohne daß sich Wertverluste zeigten.

Kurz vor Gebrauch für den Raji-Test wurde AHG zentrifugiert (4000 g/15 Min.) zur Entfernung großer, unlöslicher Aggregate.

2.4.1. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts von monomerem IgG und AHG (5,4 mg/ml) erfolgte nach einer Modifikation der Standardmethode von Lowry (41); verwendete Vorratslösungen:

Lösung A: 2 % Na_2CO_3, 0,02 % K-Na-Tartrat in dest. H_2O

Lösung B: 0.5 % $CuSO_4$ x 5 H_2O in dest. H_2O

Lösung C: 1 Volumenteil Folin-Ciocalteus-Reagenz mit
1 Volumenteil dest. H_2O gemischt.

Von der Proteinlösung wurden 0.1 bis 0.2 ml mit je 0.4 ml 1 N NaOH versetzt, geschüttelt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zu den Proben je 4 ml Lösung D, die aus 50 ml Lösung A und 1 ml Lösung B bestand, hinzugegeben, gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 Minuten wurde je 0.4 ml Lösung C hinzugefügt und nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur die Extinktion bei 578 nm im Spectralphotometer gemessen. Als Vergleichsstandard wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin (1 mg/ml) erstellt.

2.5. Rajizelltest

Zum Nachweis und zur quantitativen Erfassung von Immunkomplexen in Sera und Sputa der CF-Patienten wurde der Rajizell-Radioimmunoassay von Theofilopoulos (40) in modifizierter Form durchgeführt.

2.5.1. Prinzip des Rajizelltests

Raji-Zellen haben kein membrangebundenes IgG, jedoch Rezeptoren für den Fc-Teil von IgG und für Komplement, und zwar C_{3b} und C_{3d}. Der Test beruht auf der Fähigkeit der Zellen, menschliches IgG zu binden, wenn es entweder einen Komplex bildet oder in aggregierter Form vorliegt und wenn es C aktiviert bzw. fixiert hat. Die Bindung der IC an die Zellen wird erfaßt durch Zugabe von ^{125}J-markiertem anti human IgG, und die zellgebundene Radioaktivität kann dann am Gammacounter abgelesen werden. Eine Bindung von monomerem IgG über den Fc-Teil fällt aufgrund der geringen Anzahl von Fc-Rezeptoren nicht ins Gewicht (40). Die quantitative Bestimmung der IC wird ermöglicht anhand einer Standardkurve, die unter Verwendung von AHG (s. 2.4.) als in vitro-Modell für menschliche IC ermittelt wird. An dieser Standardkurve können die IC-Werte direkt als µg AHG equivalent/ml Serum bzw. Sputum abgelesen werden.

Abb. 1 veranschaulicht das Testprinzip.

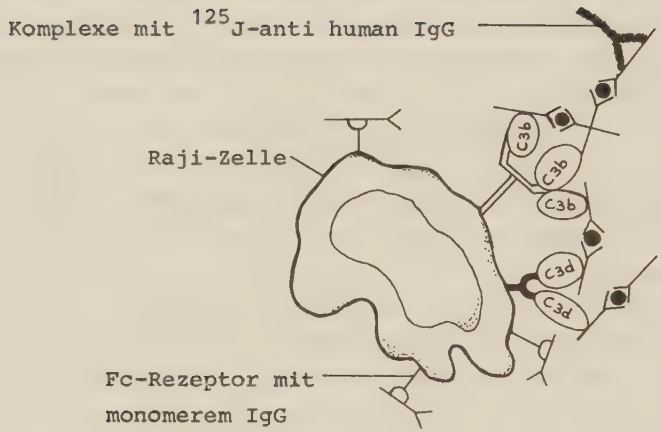

Abb. 1: Prinzip des Rajizelltests

2.5.2. Durchführung

Zur Ermittlung der Standardkurve dienten 4 verschiedene AHG-Konzentrationen (von 27 ng - 27 µg AHG/ml C in MEM); die Mikrotiterplatten wurden mit 50 µl pro Näpfchen einer Komplement (C) in MEM-Verdünnung (1:2), der verschiedene AHG-Mengen zugefügt wurden, beschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 45 Min. bei 37°C wurden 100 µl einer Rajizellsuspension (10^7/ml Medium) einpipettiert und die Inkubation wurde für 45 Min. bei gleicher Temperatur fortgesetzt. Die Zellen wurden daraufhin 3 x mit gekühltem 1 %-BSA-Medium gewaschen - BSA zur Reduzierung unspezifischer Bindungen -, und resuspendiert mit 100 µl pro Näpfchen einer Lösung von ^{125}J-anti human IgG in MEM 2 %-BSA (eingestellt auf 200 000 cpm). Nach einer 60-Minuten-Inkubation bei 4°C wurden die Zellen erneut 3 x gewaschen in MEM 1 %-BSA, und die zellgebundene Radioaktivität wurde in einem Gamma-Counter (Berthold AG, Wildbad) gemessen.
Zur Bestimmung der IC-Werte in den Serum- und Sputumproben wurden die Proben 1:2 mit einer 1:2-Verdünnung von C in MEM suspendiert und 45 Minuten inkubiert, bevor die Zellen aufgetragen wurden.
Jede Probenverdünnung wurde doppelt bestimmt.
Alle Versuche einschließlich der korrespondierenden Standardkurve wurden 2-fach ausgeführt und der Mittelwert errechnet.
Als negative Kontrolle dienten Raji-Zellen, die nicht mit AHG oder einer Testprobe inkubiert wurden.

Der Waschvorgang bei diesem Test besteht darin, daß die flexiblen Mikrotiterplatten im stabilen Plattenhalter zentrifugiert werden (800 U/30 Sek. mit einer Heraeus Minifuge 2), der Überstand vorsichtig abgekippt, die Platte für einige Sekunden auf einen Rüttler bei mittlerer Stärke = (7) gehalten wird, und daß danach die Näpfchen erneut mit Medium aufgefüllt werden.

2.5.3. Kontrollversuche

Um den Einfluß von DTT (2.2.1.) und des pH-Wertes auf die Ergebnisse des Raji-Tests zu überprüfen, wurden bestimmten AHG-Konzentrationen, die zur Ermittlung einer normalen Standardkurve verwendet wurden, zugesetzt:

1) 100 µl MEM
2) 100 µl DTT
3) 100 µl eines IC-negativen Sputums
4) 0,1 N HCl zur pH-Einstellung auf 6,8

Anschließend wurde der Raji-Test, wie beschrieben, durchgeführt und die Ergebnisse mit dem Soll-Standardkurvenwert verglichen.

pH-Werte zum Vergleich:

AHG in C in MEM:	7,8
Serum	8,2
Sputum (DTT-behandelt)	6,8

2.6. Isolierung der Immunkomplexe

Dies erfolgte in Anlehnung an die von Chenais (42) beschriebene Methode mittels Affinitätschromatographie.

Die Sputa wurden auf eine Protein A Sepharose CL-4B Säule (1,5 x 3 cm) mit Sepharose CL-4B als Matrix und Protein A als Ligand gegeben; die Säule wurde mit PBS äquilibriert.

Protein A geht Verbindungen ein mit dem Fc-Teil menschlicher IgG-Moleküle der Subklassen 1, 2 und 4, während alle anderen Immunglobuline und Serumbestandteile keine Wechselwirkung mit Protein A zeigen (42). Die gebundenen IgG-Immunkomplexe

wurden zusammen mit monomerem IgG mittels 0,1 M Glycin/HCl-Puffer (pH 2,8) bei mittlerer Geschwindigkeit (20 ml/h) eluiert.

Um den pH des Eluats so schnell wie möglich auf 8,2 (Wirkungsoptimum für 2-Mercaptoethanol) zu verschieben, wurde in den Fraktionsröhrchen 1 M NaOH vorgelegt.
Die Fraktionen wurden gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung, die spätestens nach 2 Tagen erfolgte, bei -4°C gelagert.

Zur Überprüfung, ob in den Sputa IgG_3-Komplexe, die nicht an die Protein A-Säule gebunden werden, vorhanden waren, wurden die Sputumfraktionen und zusätzlich die Durchläufe mit dem Raji-Test auf Immunkomplexe überprüft.

2.7. Behandlung der Immunkomplexe mit 2-Mercaptoethanol und Jodacetamid

2.7.1. Durchführung

In der Absicht, die Immunkomplexe zu spalten und die daran beteiligten Antigene zu isolieren, wurde eine von Fleischman (43) beschriebene Methode der reduktiven Spaltung von Gammaglobulinen angewandt.

Zunächst erfolgte eine 1-stündige Inkubation der gepoolten Fraktionen mit 0,75 M Mercaptoethanol bei Raumtemperatur und im Anschluß daran eine ebenfalls 1-stündige Inkubation mit 0,75 M Jodacetamid bei 0°C. Das Reaktionsgemisch wurde danach 48 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert, bei zweimaligem Wechsel des Puffers.

Diese Spaltungsmethode wurde ebenfalls durchgeführt bei den Durchläufen der Protein A-Säule zur Abklärung, ob noch andere, vom Raji-Test nicht erfaßte und nicht an die Säule gebundene Komplexe vorhanden sein könnten.

2.7.2. Prinzip der reduktiven Spaltung

2-Mercaptoethanol, ein Sulfhydrylreagens, löst die Disulfidbrücken beim Immunglobulin durch Reduktion,

die dabei entstehenden oxidationsempfindlichen Sulfhydrylgruppen werden durch Umsetzung mit Jodacetamid abgesättigt. Es erfolgt hier also nicht nur eine Auftrennung des Antikörpers in bestimmte Fragmente, wie z.B. mit Papain oder Pepsin, sondern es findet eine totale Aufspaltung des Moleküls statt.
Abb. 2 zeigt ein IgG-Modell mit den Disulfidbrücken.

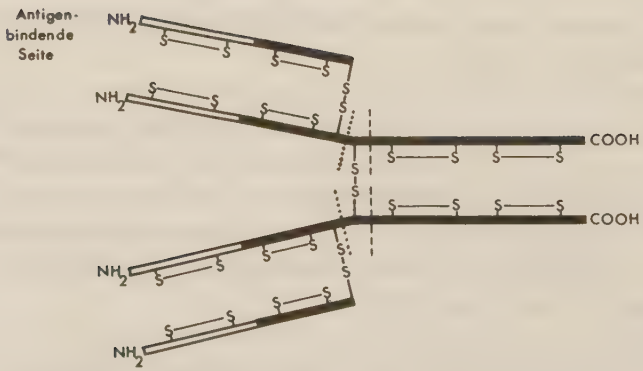

Abb. 2: IgG-Molekül
..... Spaltung durch Papain
-------- Spaltung durch Pepsin

Aminosäureanalysen haben ergeben, daß innerhalb einer Hauptimmunglobulinklasse wie z.B. IgG, die N-terminalen Teile von beiden Ketten, der schweren und der leichten beträchtliche Variationen aufweisen, während die übrigen Teile der Ketten relativ konstant strukturiert sind (44). Beide variable Regionen tragen zur Antikörperspezifität bei.

Innerhalb der variablen Region weisen bestimmte Aminosäurereste eine große Hypervariabilität auf, und diese "heißen Stellen", drei auf der leichten und drei auf der schweren Kette, liegen dicht beieinander. Man nimmt an, daß diese Stellen den Antigenbindungsort bilden. (s. Abb. 3)

Somit wird verständlich, daß die Auftrennung der Ketten in einer verminderten Antigenbindung des Antikörpers resultiert.

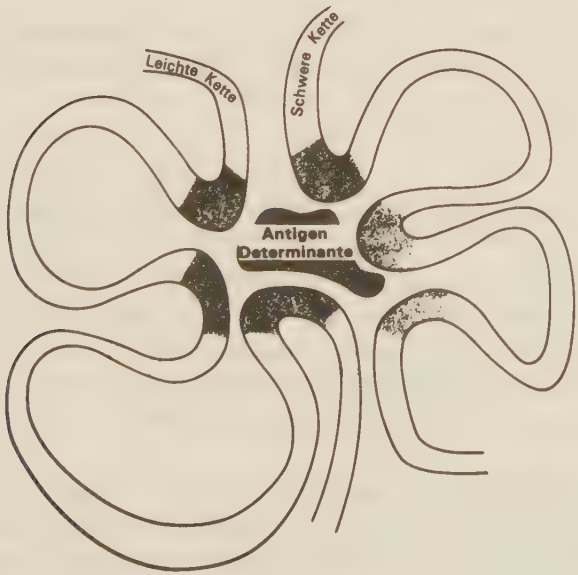

Abb. 3: Bildung einer Antigenbindungsstelle durch räumliche Angliederung von hypervariablen Regionen ("heißen Stellen") auf der leichten und der schweren Kette.

2.7.3. Kontrollversuche

Zur Kontrolle, inwieweit die Proteasenantigene durch die Mercaptoethanolkonzentration tangiert werden und wie groß die Proteasenausbeute bei gespaltenen Komplexen ist, wurden in weiteren Versuchen zum einen reine AP und Ela einer Behandlung ausgesetzt (a) und zum anderen Immunkomplexe behandelt, die hergestellt wurden durch Zugabe von gereinigter AP bzw. Ela zu einem CF-Serum mit bekannt hohem Antikörpergehalt gegen die Enzyme (b).

a) Konzentration reine AP (0,84 mg/ml) 10^{-1} in PBS
reine Ela (0,35 mg/ml) 10^{-1} in PBS

b) Konzentration CF-Serum + AP (0,84 mg/ml) 10^{-2}
CF-Serum + Ela (0,35 mg/ml) 10^{-2}

Als weiterer Kontrollversuch diente die Behandlung der reinen Ela mit einer 0,075 M - Mercaptoethanol- und -Jodacetamidkonzentration.

2.8. Radioimmunoassays zum Antigen- und Antikörpernachweis

Zum Nachweis spezifischer Antikörper (AK) gegen die AP und Ela in den Sera und Sputa der CF-Patienten, sowie zum Nachweis der beiden Proteasen im Sputum vor und nach der Behandlung mit 2-Mercaptoethanol und Jodacetamid wurden spezifische Radioimmunoassays verwendet (30, 45, 46).

Der Proteasen-RIA fand darüberhinaus Anwendung bei den Sputumfraktionen zur Abklärung, ob nicht bereits durch die Protein A-Säule oder Glycin-HCl eine Dissoziierung der Immunkomplexe stattgefunden hat.

2.8.1. Bestimmung der Proteasenkonzentration

Die feste Phase der PVC-Mikrotiterplatten wurde mit 100 µl pro Näpfchen Kaninchen-IgG-Antikörper gegen die AP bzw. Ela in einer Konzentration von 10^{-1} - 10^{-2} mg/ml in PBS beschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei Raumtemperatur (RT) wurden die Näpfchen 3 x mit PBS gespült, um nicht gebundene Antikörper auszuwaschen. Unspezifische Bindungen wurden durch Zugabe von 100 µl 5 %iger BSA-Lösung in PBS je Näpfchen reduziert. Nach 24 Stunden Inkubation bei RT wurden die Näpfchen erneut 3 x mit PBS gewaschen, bevor 100 µl der Proben (Sera, Sputa, Sputumfraktionen vor und nach Behandlung, Kontrollproben), konzentriert bis 10^{-5} reduziert (Verdünnung 1:10) einpipettiert wurden. Jede Probenverdünnung wurde doppelt bestimmt.

Verdünnungen der gereinigten Proteasen in PBS von 10^{-2} - 10^{-6} mg/ml (Verdünnungen 1:10) wurden für die quantitative Bestimmung der AP bzw. Ela auf jeder Platte als Standard mitgeführt. Nach einer Inkubation von 12 Stunden bei 4°C wurden die Näpfchen 3 x mit PBS gespült. 100 µl einer Lösung von ^{125}J-IgG gegen die AP bzw. die Ela in PBS mit 5 %-BSA (eingestellt auf 200 000 cpm) wurden in jedes Näpfchen gegeben und die Platte 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Nachdem die Näpfchen 3 x mit PBS gewaschen waren, wurde die Radioaktivität in jedem Näpfchen mit einem Gamma-Counter gemessen.

Die AP- bzw. Ela-Konzentration der einzelnen Proben wurde folgendermaßen bestimmt:

Die Titrationskurve für die AP bzw. Ela wurde erhalten, indem die gebundene Radioaktivität (cpm) auf der Ordinate im linearen Maßstab und die Verdünnungen der jeweiligen gereinigten Protease bzw. der Proben im logarithmischen Maßstab auf der Abszisse aufgetragen wurden.

Für die quantitative Proteasenbestimmung sollen die Eichkurve für die jeweilige Protease und die Titrationskurven der Proben

in einem Bereich linear verlaufen und zueinander parallel sein.

Die Berechnung der AP- bzw. der Ela-Konzentration in mg/ml erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Verdünnung der Probe}^{+}}{1} = \frac{\text{Menge an AP}^{+} \text{ bzw. Ela}^{+} \text{ (mg/ml)}}{X}$$

+ = Verdünnungen der Proben und Menge der entsprechenden Protease bei demselben cpm-Wert im linearen Teil der Kurve

2.8.2. Bestimmung des Antikörpergehaltes

Die Schritte bis zur Absättigung der Näpfchen mit 5 %iger BSA-Lösung wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Nach dem Waschen der Mikrotiterplatten mit PBS wurden 100 µl einer AP- bzw. Ela-Lösung (10^{-2} mg/ml) in jedes Näpfchen pipettiert. Die Platten wurden 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Nachdem die Näpfchen 3 x mit PBS gewaschen waren, wurden 100 µl der Probenverdünnungen (konzentriert bis 10^{-6}, Verdünnungen 1:10) in die Näpfchen gegeben. Jede Serumverdünnung wurde doppelt bestimmt. Nach 12-stündiger Inkubation bei 4°C wurden die Platten 3 x mit PBS gewaschen und 100 µl einer Lösung von ^{125}J anti human IgG (200 000 cpm) mit 5 % BSA in PBS in jedes Näpfchen gegeben. Die Platten wurden anschließend bei 4°C 12 Stunden inkubiert, dann 3 x gewaschen und die gebundene Radioaktivität (cpm) mit dem Gamma-Zähler gemessen. Die maximale Bindung des Tracers wurde erhalten, indem pro Platte 8 Näpfchen mit PBS beschickt wurden.

Zur AK-Titerbestimmung der einzelnen Proben (Sera, Sputa, Sputumfraktionen nach Behandlung) wurde die gebundene Radioaktivität (cpm) auf der Ordinate im linearen Maßstab und die Probenverdünnung auf der Abszisse im logarithmischen Maßstab aufgetragen und die Punkte verbunden. Der AK-Titer wurde

mit der Linie, die 75 % der MB angibt, das Lot auf die Abszisse fällt und den Wert abliest. Werte, die unter 75 % der maximalen Bindung lagen - der Wert von 75 % wurde willkürlich festgelegt -, wurden als positive AK-Titer gegen die AP bzw. die Ela angesehen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Nachweis von Immunkomplexen in Sputa und Sera

Zur quantitativen Erfassung der IC diente eine Standardkurve, die erhalten wurde, indem verschieden hohe AHG-Konzentrationen in C in MEM den Raji-Zellen zugesetzt wurden.

Der Anteil der lebenden Zellen betrug im Schnitt 80 - 90 %. Abb. 4 zeigt eine Standardkurve.

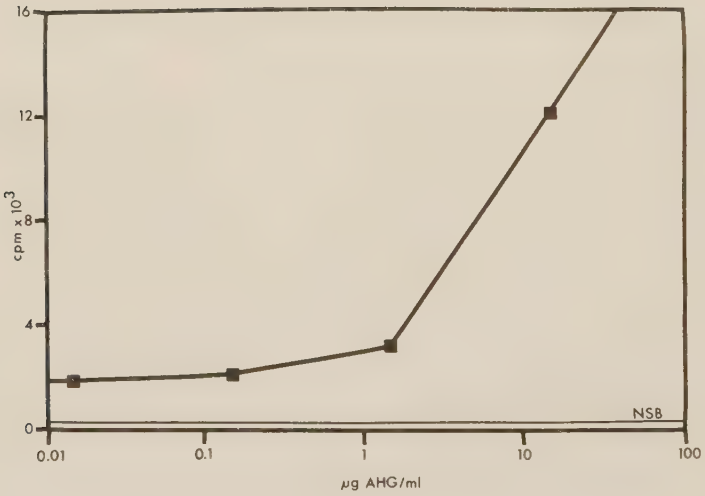

Abb. 4: Bindung von ^{125}J-markiertem anti human IgG an die Rajizellen nach Zugabe verschiedener AHG-Konzentrationen.

An dieser Kurve lassen sich die IC-Werte direkt als µg AHG equivalent/ml Sputum bzw. Serum ablesen, indem man vom Schnittpunkt mit der Kurve das Lot auf die Abszisse fällt. Die unspezifische Bindung (NSB) des radioaktiv markierten Antikörpers lag bei 200 cpm (bei 300 000 cpm/100 µl Tracerlösung.) Die Nachweisgrenze der Kurve konnte somit auf 0,1 µg AHG equivalent/ml festgelegt werden, entsprechend einem 6-fachen Wert der NSB.

Die Kontrollversuche ergaben, daß weder DTT in der hier verwendeten Konzentration noch die verschiedenen pH-Werte im Bereich zwischen 6,8 und 9,0 einen negativen Einfluß auf das Raji-Testergebnis hatten.

In der oben beschriebenen Weise wurden mit dem Raji-Test 7 Sputen mit positiven IC-Werten ermittelt, zwischen 0,1 und 16 µg AHG equivalent/ml Sputum.

Die auf IC untersuchten Seren der 12 Patienten waren alle negativ.

Aufgezeigt ist dieses Ergebnis in Tabelle 1, S. 28.

Die IC-Untersuchung der Sputumfraktionen nach Affinitätschromatographie ergab dieselben Werte wie bei den Sputa; der zusätzlich durchgeführte Raji-Test bei den Durchläufen der Protein A-Säule war in allen Fällen negativ.

3.2. Aufspaltung der Immunkomplexe

3.2.1. Immunkomplex-Isolierung

Die Immunkomplexe wurden aus den Sputa zusammen mit monomerem IgG mittels Affinitätschromatographie an Protein A Sepharose CL-4B isoliert. Ein typisches Chromatogramm zeigt Abb. 5.

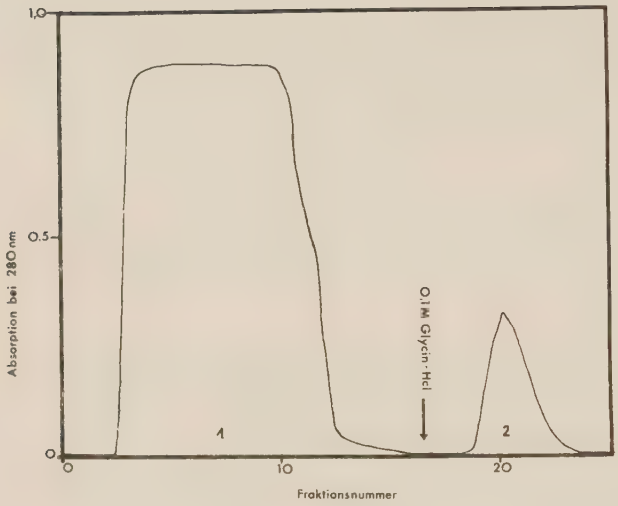

Abb. 5: Affinitätschromatographie eines CF-Sputums an Protein A Sepharose CL-4B.
1,0 auf der Ordinate = 100 %

Komplexe und Globuline der IgG-Subklassen 1, 2 und 4 werden an die Säule gebunden (Peak 2), während alle anderen Immunglobuline und Serumbestandteile keine Wechselwirkung mit Protein A zeigen (Peak 1) (42).

Peak 2 zeigte erhebliche Unterschiede in Form und Größe bei den chromatographierten Sputa, jedoch in keinem erkennbaren Zusammenhang mit dem IC-Gehalt stehend.

3.2.2. Bestimmung der Proteasenkonzentration

Der Nachweis freier Proteasen im RIA (s. Tab. 1, S. 28) war in keinem der untersuchten Sputa möglich, ebensowenig in den untersuchten Sputumfraktionen nach Affinitätschromatographie. Nach der Behandlung mit 2-ME und Jodacetamid waren bei 60 % der Patienten Proteasen vorhanden, und zwar in den Fällen mit nachgewiesenen Immunkomplexen. Bei den IC-negativen Sputa waren keine Proteasen nach Behandlung nachweisbar.

Die Proteasenkonzentrationen wurden wie unter (2.8.) beschrieben berechnet; es sind Mittelwerte aus zwei Messungen. Sie liegen im Nanogrammbereich (zw. 5 und 200 ug/ml Sputum).

Die ebenfalls mit der Spaltungsmethode behandelten Durchläufe der Protein A-Säule hatten alle ein negatives Proteasenergebnis.

3.3. Bestimmung der Antikörpertiter gegen die alkalische Protease und die Elastase

Alle 12 Patienten hatten spezifische Antikörper gegen die AP und Ela im Serum (1:5 - 1:1000), und 8 Patienten hatten AK im Sputum (1:5 - 1:100). Beim Vergleich der beiden Ergebnisse (s. Tab. 1, S. 28) ist ersichtlich, daß im Serum durchweg höhere AK-Mengen (mindestens 10 x mehr) als im Sputum vorhanden sind.

Die Antikörpertiter sind Mittelwerte aus zwei Messungen mit einer mittleren prozentualen Abweichung von 25 %.

Nach der chemischen Behandlung der Sputa waren keine Antikörper im RIA mehr nachweisbar; die Zerstörung der Immunglobuline durch 2-ME hat demnach stattgefunden.

Tab. 1: Antikörper (AK)-Titer gegen die alkalische Protease (AP) und die Elastase (Ela) sowie Immunkomplexwerte (IC) im Serum und Sputum von Patienten mit cystischer Fibrose und chronischer P. aeruginosa Lungeninfektion; Proteasenkonzentration im Sputum und in Immunkomplexen nach Aufspaltung.
IC = µg AHG equivalent/ml Serum bzw. Sputum

Patient Nr.	Serum			Sputum						
	Antikörper gegen		IC	Antikörper gegen		IC	Proteasen		Proteasen in IC nach Aufspaltung	
	AP	Ela		AP	Ela		AP	Ela	AP	Ela
	(1/titer)			(1/titer)			(ng/ml)		(ng/ml)	
1	310	84	-	7	5	16.5	-	-	32	22
2	140	750	-	-	29	3.0	-	-	200	40
3	70	1000	-	8	36	3.4	-	-	60	10
4	865	1000	-	30	100	6.4	-	-	20	6
5	520	430	-	7	60	0.1	-	-	-	17
6	480	230	-	40	50	0.9	-	-	5	18
7	1000	480	-	80	45	0.8	-	-	37	50
8	50	380	-	5	55	-	-	-	-	-
9	7	105	-	-	-	-	-	-	-	-
10	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-
11	43	63	-	-	-	-	-	-	-	-
12	89	625	-	-	-	-	-	-	-	-

3.4. Kontrollversuche

Um den Einfluß der Mercaptoethanolkonzentration auf die Enzyme zu überprüfen, wurden Kontrollexperimente durchgeführt; zum einen wurden die gereinigte AP sowie Ela behandelt und mit den entsprechenden unbehandelten Enzymen in den RIAs verglichen (s. Abb. 6, S. 30).

Es zeigte sich, daß die behandelte AP einen schwachen Abfall gegenüber der Standardkurve aufwies, während bei der Ela ein hoher Verlust zu verzeichnen war.

Zum anderen wurden Seren mit bekannt hohem Antikörpertiter gegen die Elastase und die alkalische Protease mit AP bzw. Ela eine Stunde bei 37°C inkubiert zur Bildung von "invitro-IC". Den Beweis, daß 100 %ige Absättigung hierbei stattfand, erbrachte das positive Raji-Test- und das negative Proteasenergebnis dieser Mischungen. Auch diese wurden einer chemischen Behandlung unterzogen, und der Proteasen-RIA ergab für die AP eine Kurve, die mit der Standardkurve übereinstimmte, während bei der Ela wiederum ein starker Abfall zu verzeichnen war, diesmal jedoch weniger (ca. 10 %) als bei der Behandlung der reinen Ela.

In Abb. 6 sind die Ergebnisse dieser Kontrollexperimente aufgezeigt.

Daß der hohe Ela-Verlust eine Folge der verwendeten 2-ME-Menge ist, bewies ein Versuch, bei dem der gereinigten Elastase eine 0,075-2-Mercaptoethanol- und Jodacetamidkonzentration zugesetzt wurde. Gemessen an der Standardkurve, waren die erhaltenen Ela-Werte im Radioimmunoassay lediglich um ca. 10 % verringert.

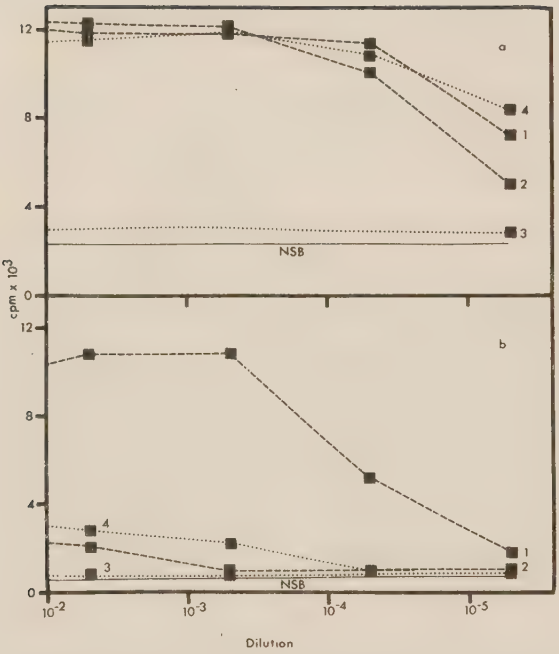

Abb. 6: Effekt von 2-Mercaptoethanol und Jodacetamid auf die alkalische Protease (a) und die Elastase (b).

1 = Kontroll-Puffer + 10^{-2}mg/ml AP bzw. Ela vor Behandlung

2 = Kontroll-Puffer + 10^{-2}mg/ml Ela bzw. AP nach Behandlung

3 = CF-Serum + 10^{-2}mg/ml AP bzw. Ela vor Behandlung

4 = CF-Serum + 10^{-2}mg/ml AP bzw. Ela nach Behandlung

4. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit zeigt einen hohen Prozensatz von Sputa mit Immunkomplexen bei CF-Patienten mit chronischer P. aeruginosa-Lungeninfektion. Dieses Ergebnis stimmt überein mit dem von Schiøtz (35), und es bekräftigt die Vermutung, daß die Gewebszerstörung in der Lunge bei CF-Patienten teilweise auf IC zurückzuführen ist.

Das negative IC-Ergebnis bei den Sera der chronisch-infizierten CF-Patienten kann einmal auf der Lagerung bei -20°C beruhen, zum anderen deckt es sich mit dem anderer Autoren, die Immunkomplexe im Serum nur während einer akuten Exazerbation fanden, nicht aber oder nur zu einem geringen Prozentsatz bei Patienten mit klinisch unverändertem Krankheitsbild (11, 13, 15). Außerdem werden, wie bereits erwähnt, mit den verschiedenen IC-Nachweismöglichkeiten unterschiedliche Eigenschaften der IC erfaßt, so daß bei der Untersuchung desselben Materials mit mehreren Tests völlig konträre Ergebnisse zustandekommen können, die sich nicht direkt miteinander vergleichen lassen. Dies wird deutlich in einer Studie von Church (13), und hier weisen die mit dem Raji-Test erzielten Ergebnisse bei chronisch infizierten CF-Patienten keine positiven oder nur gering erhöhte µg AHG-Werte auf.

Der Raji-Test gehört zu den wenigen IC-Nachweismethoden, denen in einer kollaborativen WHO-Studie (47) von insgesamt 18 ausgewählten Systemen die höchste Zuverlässigkeit, Empfindlichkeit und Spezifität zugesprochen wird. Zudem zeichnet er sich durch eine gute Reproduzierbarkeit aus.

Bisher ausschließlich zum Immunkomplex-Nachweis in Patientenseren herangezogen, wurde die Methode in dieser Arbeit zum erstenmal für die Untersuchung von Sputum auf Immunkomplexe verwendet. Der Unterschied in der Durchführung war der, daß statt normalem menschlichem Serum eine Meerschweinchenkomplement in MEM-Verdünnung als Komplementquelle diente.

Die Beschränkung des Raji-Tests liegt darin, daß lebende Zellen erforderlich sind, daß nur Komplexe erfaßt werden, die Komplement aktivieren und daß nur Komplexe von bestimmter Größe erfaßt werden (11 - 18 S), (13, 40).

Mit dem C1q-Test z.B. (7, 8, 10, 48, 49, 50) lassen sich ebenfalls komplementfixierende Komplexe, jedoch kleinere (8 - 11 S) bestimmen, während bei der PEG-Methode (3, 51) keine Abhängigkeit vom Komplementsystem vorliegt, also eine umfassendere Immunkomplex-Bestimmung möglich ist.
Der Nachteil des C1q-Tests liegt darin, daß C1q nicht nur mit aggregiertem Gammaglobulin oder Immunkomplexen zu reagieren in der Lage ist, sondern auch Wechselwirkung zeigt mit bestimmten Endotoxinen, DNS oder mit monomerem IgG (52).

Die Tatsache, daß auf der Tabelle (s. S. 28) keine Korrelation zwischen den Immunkomplexen-Werten und den nach der Spaltung erhaltenen Proteasenwerten zu erkennen ist, könnte damit erklärt werden, daß der Raji-Test nur Komplexe von bestimmter Größe identifiziert. Ein weiterer Grund könnte der sein, daß mit anderen pathogenen Bakterien neben P. aeruginosa eine Komplexbildung stattfindet oder daß andere Enzyme, Toxine oder Zellwandbestandteile von P. aeruginosa an der IC-Bildung beteiligt sind.

Der Raji-Test erfaßt mit hoher Spezifität Immunkomplexe der Subklassen 1, 2 und 3. Da bei der Säulenchromatographie (s. 2.6.) IgG der Subklasse 3 keine Interaktion mit Protein A eingeht, kommen in der vorliegenden Arbeit als Ausgangsmaterial für die chemische Behandlung mit 2-Mercaptoethanol und Jodacetamid nur IC der IgG-Subklassen 1 und 2 in Frage.

Zur Kontrolle, ob und in welcher Quantität IgG_3-Komplexe vorgelegen hätten, wurden der Durchlauf der Protein A-Säule

ebenso wie das Glycin-HCl-Eluat auf IC geprüft, mit dem Ergebnis, daß keine - zumindest mit dem Raji-Test erfaßbare - IgG_3-Komplexe im Sputum vorhanden waren. Die Protein A-Säule stellt somit keine Begrenzung in der Versuchsdurchführung dar.

Letzteres trifft ebenso zu für den Punkt, daß eine teilweise Dissoziierung von Komplexen bereits durch die Protein A-Säule bzw. 0,1 N Glycin-HCl stattgefunden haben könnte: der Proteasen-RIA der Sputumfraktionen vor der Behandlung mit 2-Mercaptoethanol und Jodacetamid war in allen Fällen negativ.

Die Frage, ob die Möglichkeit besteht, daß neben IgG- auch IgA- oder IgM-Komplexe dissoziiert wurden, kann nicht ganz klar beantwortet werden. Die Wahrscheinlichkeit, daß solche Immunkomplexe an die Säule gebunden wurden, ist gering, wenngleich von einigen Autoren gewisse Wechselwirkungen von IgA- und IgM-Molekülen mit Protein A beschrieben worden sind (53, 54, 55).

Die Immunglobuline A und M spielen bei CF-Patienten mit chronischer P. aeruginosa-Infektion zweifellos eine Rolle (35, 38, 56), wieweit sie jedoch an einer Immunkomplex-Bildung beteiligt sind und wieweit solche Komplexe für die Pathogenität bei der cystischen Fibrose verantwortlich sind, bleibt offen. Die Meinungen hierzu sind widersprüchlich (1, 15).

Um jedoch Rückschlüsse auf die Anwesenheit von nicht IgG-Komplexen im Sputum ziehen zu können, wurde der Durchlauf der Protein A-Säule mit 2-Mercaptoethanol und Jodacetamid behandelt. Das negative Proteasenergebnis deutet darauf hin, daß entweder keine IgM- oder IgA-Komplexe vorlagen oder aber, daß vorhandene Komplexe mit dieser Spaltungsmethode nicht tangiert wurden. Letzteres ließe sich damit erklären, daß IgA_2 keine Disulfidbrücken aufweist.

Die Methode der reduktiven Spaltung, von Fleischman (43) entwickelt, um bei IgG-Molekülen leichte von schweren Ketten zu trennen, wurde in dieser Arbeit angewandt davon ausgehend, daß leichte und schwere Kette an der Antigenbindung partizipieren. Eine vollständige Auftrennung der beiden Ketten muß somit zum Verlust der Antigenbindungskapazität führen.

Die einfach durchzuführende Methode ist jedoch nur anwendbar, wenn das Antigen der 2-Mercaptoethanol- und Jodacetamidkonzentration standhält.

In diesem Punkt liegt auch die Schwierigkeit bei anderen bereits entwickelten IC-Dissoziierungsmethoden, wie Spaltung durch Säure- oder Hitzeeinwirkung (3, 14, 52, 57, 58, 59); und auf die IC bei CF angewandt, haben sie nicht zum gewünschten Erfolg geführt (15, 16).

Kontrollversuche mit gereinigten Enzymen allein oder mit Enzymen, die zur Komplexbildung mit Antiseren inkubiert wurden, zeigten, daß durch die Behandlung mit 2-Mercaptoethanol und Jodacetamid bei der AP ein verschwindend geringer, bei der Ela hingegen ein großer Verlust zu verzeichnen war. Letzteres könnte auf das Vorhandensein von Cystinresten in der Aminosäuresequenz der Elastase zurückzuführen sein (58). Trotzdem war es möglich, mittels des empfindlichen RIAs (s. 2.8.1.) Elastase nachzuweisen, und der Unterschied im Ergebnis der Enzyme, allein oder komlexiert behandelt, zeigt, daß ein positiver Nachweis mithin eine Frage der Konzentration der verwendeten Reagentien ist; im Experiment mit Ela-IC wird die 2-Mercaptoethanolkonzentration durch andere, Disulfidbrücken enthaltende Proteine vermindert.

Man kann also davon ausgehen, daß die tatsächliche Ela-Konzentration in IC unter Berücksichtigung des Verlustes bei der Behandlung um zwei Zehnerpotenzen über dem gemessenen Wert liegt.

Frühere Erkenntnisse (31), daß P. aeruginosa-Antigene im Sputum von CF-Patienten nicht nachweisbar sind in Gegenwart von Antikörpern gegen diese Enzyme, wurden mit dieser Arbeit bestätigt; ebenso konnte die Hypothese, daß Immunkomplexe bei der cystischen Fibrose die alkalische Protease und die Elastase als Antigene enthalten, bekräftigt werden. Damit wird diesen beiden Enzymen ein völlig neuer Stellenwert vermittelt hinsichtlich weiterer Untersuchung und Therapie.
Es muß in diesem Zusammenhang sicherlich auch der Bedeutung der Gewebszerstörung bewirkenden IC in Zukunft mehr Beachtung geschenkt werden; denn daß eine Untersuchung des Sputums oder Bronchialsekrets auf Immunkomplexe sehr viel wesentlicher und aufschlußreicher ist als bisher durchgeführte Serumuntersuchungen, konnte mit dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden.

Bis heute gibt es keine Studie, die eine direkte Beziehung zwischen der Lungenfunktion und der Anwesenheit von IC in der Lunge bzw. im Sputum erforscht hat.
Das Hauptproblem hierbei liegt darin begründet, daß das klinische Bild bei CF mit chronischer P. aeruginosa-Infektion oft durch antibiotische Therapie verfälscht wird und daß sich die Grenzen zwischen gestörter Lungenfunktion einerseits und der zusätzlichen Störung durch Überlagerung einer Infektion andererseits verwischen.
Es wird demzufolge eine Langzeitstudie über Jahre hinaus erforderlich sein über IC im Sputum in Korrelation mit dem klinischen Zustand des Patienten unter Berücksichtigung der momentanen medikamentösen Substitution.

Die hier angewandte Methode der reduktiven Spaltung von Immunkomplexen eröffnet die Möglichkeit, andere P. aeruginosa-Antigene in IC aufzufinden und, ganz allgemein, andere an IgG-Komplexen partizipierende Antigene zu identifizieren, sofern diese der 2-Mercaptoethanol- und Jodacetamidkonzentration standhalten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mit dem Rajizelltest wurden die Sera und Sputa von 12 Patienten, die an cystischer Fibrose und chronischer P. aeruginosa-Lungeninfektion erkrankt sind, auf Immunkomplexe untersucht; daneben wurden spezifische Radioimmunoassays angewandt zur Identifizierung von alkalischer Protease und Elastase sowie von Antikörpern gegen diese beiden Enzyme.

Alle Patienten hatten hohe Antikörpertiter gegen die Enzyme im Serum, bei 8 Fällen konnten AK im Sputum festgestellt werden, jedoch mit niedrigeren Werten (mindestens 10 %) als im Serum.

Der Immunkomplextest ergab bei den Sera negative Ergenisse, 58 % der untersuchten Sputa waren IC-Positiv.

Die IC sowie monomeres IgG der Sputa wurden auf einer Protein A-Säule fraktioniert, und nach Elution mittels Glycin-HCl erfolgte eine Aufspaltung der Immunkomplexe mit 2-Mercaptoethanol und Jodacetamid. Nach dieser chemischen Behandlung ließen sich bei den IC-positiven Sputa die Proteasen nachweisen (5 - 200 µg/ml).

Zur Absicherung der Spaltungsmethode wurden im Kontrollexperiment Immunkomplexe gebildet, indem die gereinigte AP bzw. Ela mit CF-Patientenseren von bekannt hohem Antikörpergehalt gegen die Enzyme vermischt wurden. Die IC-Bildung wurde bestätigt durch negativen Enzymnachweis und positiven Rajizelltest. Diese IC wurden mit 2-Mercaptoethanol und Jodacetamid behandelt und die erfolgte Aufspaltung bewiesen durch positiven Nachweis der Proteasen.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei Patienten mit cystischer Fibrose und P. aeruginosa-Lungeninfektion die Pseudomonas-Proteasen nach Einsetzen der Immunantwort

auf den Erreger durch IC-Bildung neutralisiert werden und daß allem Anschein nach eine in situ-Formation dieser Immunkomplexe in der Lunge stattfindet.

Literaturverzeichnis

1. Williams, R. C., Jr. (1980). Immune complexes in clinical and experimental medicine.
Harvard University Press Cambridge, Massachusetts and London, England.

2. Levinsky, R. J., Soothill, J. F. (1979). The heterogeneity of IC in disease. In: Peeters, H. (ed.): Proteides of the biological fluids.
Pergamon, Oxford, p. 243-246.

3. Paganelli, R., Levinsky, R. J., Atherton, D. J. (1981). Detection of specific antigen within circulating immune complexes: validation of the assay and its application to food antigen-antibody complexes formed in healthy and food-allergic subjects.
Clin. Exp. Immunol. 46, 44-53.

4. Wilson, C. B., Dixon, F. G. (1974). Diagnosis of immunopathologic renal disease.
Kidney Ant. 5, 389-401.

5. Theofilopoulos, A. N., Dixon, F. J. (1979). Biology and detection of immune complexes.
Adv. Immunol. 28, 89-220.

6. Dixon, F. J., Feldman, J. D., Vazquez, J. (1961). Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis.
J. Exp. Med. 113, 899-919.

7. Zubler, R. H., Lange, G., Lambert, P. H., Miescher, P. H. (1976). Detection of immune complexes in unheated sera by a modified ^{125}J-C1q binding test.
J. Immunol. 116, 232-235.

8. Hay, F. C., Nineham, L. J., Roitt, I. M. (1976). Routine assay for the detection of immune complexes of known immunoglobulin class using solid phase C1q. Clin. Exp. Immunol. 24, 396-400.

9. Sano, H., Morimoto, C. (1982). DNA isolated from DNA/anti DNA antibody immune complexes in systemic lupus erythematosus is rich in guanine-cytosine content. J. Immunol. 128, 1341-1345.

10. Nydegger, U. E., Lambert, P. H., Gerber, H., Miescher, P. H. (1974). Circulating immune complexes in the serum in systemic lupus erythematosus and in carriers of hepatitis B antigen. J. Clin. Invest. 54, 297-309.

11. Schiøtz, P. O., Høiby, N., Juhl, F., Permin, H., Nielsen, H., Svehag, S. E. (1977). Immune complexes in cystic fibrosis. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C, 85: 57-64.

12. Berdischewsky, M., Pollack, M., Young, L. S., Chia, D., Osher, A. B., Barnett, E. V. (1980). Circulating immune complexes in cystic fibrosis. Pediatr. Res. 14, 830-833.

13. Church, J. A., Jordan, S. C., Keens, T. G., Chun-I, Wang (1981). Circulating immune complexes in patients with cystic fibrosis. Chest 80, 405-411.

14. Moss, R. B., Lewiston, N. J. (1980).Immune complexes and humoral response to P. aeruginosa in cystic fibrosis. Amer. Rev. Resp. Dis. 121, 23-29.

15. Moss, R. B., Yao-Pi, Hsu (1982). Isolation and characterization of circulating immune complexes in cystic fibrosis.
Clin. Exp. Immunol. 47, 301-308.

16. Pitcher-Wilmott, R. W., Levinsky, R. J., Matthew, D. J. (1982). Circulating soluble immune complexes containing P.-aeruginosa antigens in cystic fibrosis.
Archives of Disease in Childhood 57, 577-581.

17. Manthei, U., Taussing, L. M., Beckermann, R. C., Strunk, R. C. (1982). Circulating immune complexes in cystic fibrosis.
Amer. Rev. Respir. Dis. 126, 253-257.

18. Mc Farlane, H., Holzel, A., Brenchley, A., Allan, J. D., Wallwork, J. C., Singer, B. E., Worsley, B. (1975).
Immune complexes in cystic fibrosis.
Brit. Med. J. 1, 423-428.

19. Wood, R. E., Boat, T. F., Doershuk, C.F. (1976).
Cystic fibrosis.
Amer. Rev. Resp. Dis. 113, 833-978.

20. Schiøtz, P. O., Jörgensen, M., Flensborg, E. W., Faero, O., Husby, S., Høiby, N., Jacobsen, S. V., Nielsen, H., Svehag, S. E. (1983). Chronic P. aeruginosa lung infection in cystic fibrosis.
Acta Paediatr. Scand. 72, 283-287.

21. Friis, B. (1979). Chemotherapy of the chronic infections with mucoid P. aeruginosa in lower airways of the patients with cystic fibrosis.
Scand. J. Infect. Dis. 11, 211-217.

22. Di Sant' Agnese, P. A., Davis, P. B. (1976). Research in cystic fibrosis.
N. Engl. J. Med. 295, 597-602.

23. Liu, P. V. (1974). Extracellular toxins of P. aeruginosa.
J. Infect. Dis. 130. 594-599.

24. Peterson, P. K. (1980). Host defense against P. aeruginosa. In: Sabath, L. D. (ed.): P. aeruginosa, the organism, diseases it causes and their treatment.
Hans Huber Publishers, Bern, p. 103-118.

25. Schultz, D. R., Miller, K. D. (1974). Elastase of P.-aeruginosa: inactivation of complement components and complement-derived phagocytic factors.
Infect. Immun. 10: 128-135.

26. Döring, G., Obernesser, H.-J., Botzenhart, K. (1981). Extra-cellular toxins of P. aeruginosa II. Effect of two proteases on human immunoglobulins IgG, IgA and secretory IgA.
Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (A) 249: 89-98.

27. Gray, L., Kreger, A. (1979). Microscopic characterization of rabbit lung damage produced by P. aeruginosa proteases.
Infect. Immun. 23: 150-159.

28. Kawaharajo, K., Homma, J. Y., Aoyama, Y., Morihara, K. (1975). In vivo studies on protease and elastase from P. aeruginosa.
Jpn. J. Exp. Med. 45: 89-100.

29. Woods, D. E., Crys, S. J., Friedman, R. L., Iglewski, B. H. (1982).
Contribution of Exotoxin A and elastase to virulence of P. aeruginosa in chronic lung infections of rats.
Infect. Immun. 36: 1223-1228.

30. Döring, G., Obernesser, H.-J., Botzenhart, K., Flehmig, B., Høiby, N., Hofmann, A. (1983).
Proteases of P. aeruginosa in patients with cystic fibrosis.
J. Infect. Dis. 147: 744-750.

31. Döring, G., Høiby, N. (1983). Longitudinal study of immune response to P. aeruginosa antigens in cystic fibrosis.
Infect. Immun., in press.

32. Schiøtz, P. O., Nielsen, H., Høiby, N., Glikmann, G., Svehag, S. E. (1978). Brief report.
Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C, 86: 37-40.

33. Turk, J. L., Swartz, M. N. (1979). Immunology of chronic infections. In: Dick, G. (ed.): Immunological aspects of infections diseases. MPT Press Limited, England, p. 421-452.

34. Høiby, N., Flensborg, E. W., Beck, B., Friis, B., Jacobsen, S. V., Jacobsen, L. (1977).
P. aeruginosa infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of P. aeruginosa precipitins determined by means of crossed immunelectrophoresis.
Scand. J. Reps. Dis. 58, 65-79.

35. Soter, N. A., Mihm, M. C., Colten, H. R. (1979). Cutaneous necrotizing venulitis in patients with cystic fibrosis. J. Pediatr. 95, 197-201.

36. Matthews, W. J., Williams, M., Oliphant, B., Geha, R., Colten, H. R. (1980). Hypogammaglobulinemia in patients with cystic fibrosis. N. Engl. J. Med. 302, 245-249.

37. Talamo, R. C., Stiehm, E. R., Schwartz, R. H. (1976). Immunologic aspects of cystic fibrosis. In: Mangos, J. A. and Talamo, R. C. (editors): Cystic fibrosis, projections into the future. Symposia specialists medical books, New York, p. 195-217.

38. Hann, S., Holsclaw, D. (1976). Interactions of P. aeruginosa with immunglobulins and complement in sputum. Infect. Immun. 14, 114-117.

39. Hammerschlag, M. R., Harding, L., Macone, A., Smith, A. L., Golmann, D. A. (1980). Bacteriology of sputum in cystic fibrosis: evaluation of DTT as a mucolytic agent. J. Clin. Microbiol. 11, 552-557.

40. Theofilopoulos, A. N., Wilson, C. B., Dixon, F. J. (1976). The raji cell radioimmunoassay for detecting of immune complexes in human sera. J. Clin. Invest. 57, 169-182.

41. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. J., Randall, R. J. (1951).
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275.

42. Chenais, F., Virella, G., Patrick, C. C., Fudenberg, H. H. (1977).
Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A-Sepharose as substrate.
J. Immunol. Methods 18, 183-192.

43. Fleischman, J. B., Pain, R., Porter, R. R. (1961).
Reduction of gammaglobulins.
Arch. Biochem. Biophys. Suppl. 1, 174-180.

44. Roitt, I. (1977). Immunologie.
Steinkopf-Verlag, Darmstadt, FRG, S. 30-31.

45. Döring, G., Obernesser, H.-J., Botzenhart, K. (1982).
Extrazellular toxins of P. aeruginosa III.
Radioimmunoassay for detection of alkaline protease.
Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (A) 252, 239-247.

46. Obernesser, H. J., Döring, G. (1982).
Extrazellular toxins of P. aeruginosa IV.
Radioimmunoassay for detection of elastase.
Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (A) 252, 248-256.

47. Lambert, P. H., Dixon, F. J., Zubler, R. H., Agnello, V., Cambiasso, C., Casali, P., Clarke, J., Cowdery, J. S., Mc. Duffie, F. C., Hay, F. C., Mac Lennen, I. C. M., Masson, P., Müller-Eberhard, J. H., Pentinen, K., Smith, M., Tappeiner, G., Theofilopoulos, A. N., Verroust, P. A. (1978).
A collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum.
J. Lab. Clin. Immunol. 1, 1-15.

48. Gabriel, A., Agnello, V. (1977).
Detection of immune complexes. Use of C1q and monoclonal rheumatoid factor.
J. Clin. Invest. 59, 990-1001.

49. Casali, P., Lambert, P. H. (1979).
Purification of soluble immune complexes from serum using polymethylmethacrylate beads coated with conglutinin or C1q.
Clin. Exp. Immunol. 37, 295-309.

50. Sobel, A. T., Bokisch, V. A., Müller-Eberhard, H. J. (1975). C1q-deviation test for the detection of immune complexes, aggregates of IgG, and bacterial products in human serum.
J. Exp. Med. 142, 139-150.

51. Chia, D., Barnett, E. V., Yamagata, J., Knutson, D., Restivo, C., Fürst, D. (1979).
Quantitation and characterization of soluble immune complexes precipitated from sera by polyethylene glycol (PEG).
Clin. Exp. Immunol. 37, 399-407.

52. Theofilopoulos, A. N., Eisenberg, R. A., Dixon, F. J. (1978).
Isolation of circulating immune complexes and production of antiserum.
J. Clin. Invest. 61, 1570-1581.

53. Grov, A. (1976). Human colostral IgA interacting with staphylococcal protein A.
Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C, 84: 71-72.

54. Patrick, C. C., Virella, G., Koistinen, J., Fudenberg, H. H. (1977). Differential binding of IgA proteins of different subclasses and allotypes to staphylococcal protein A.
Z. Immun.-Forsch. 153, 466-469.

55. Saltvedt, F., Harboe, M. (1976). Binding of IgA to protein A-containing staphylococci: Relationship to subclass.
Scand. J. Immunol. 5, 1103-1108.

56. Pernice, W., Sedlacek, H. H. (1978). Antigen-specific detection of soluble immune complexes by a solid phase specific antibody system.
J. Immunol. Methods 28, 33-40.

57. Dambuyant, C., Burton-Kee, J., Mowbray, J. F. (1978). The use of the preparation of $F(ab)^2$-antibody from soluble immune complexes to determine the complexed antigens.
J. Immunol. Methods 24, 31-38.

58. Gupta, R. C., Tan, E. M. (1981). Isolation of circulating immune complexes by conglutinin and separation of antigen from dissociated complexes by immobilized protein A.
Clin. Exp. Immunol. 46, 9-19.

59. Tabbarrah, Z. A., Wheat, L. J., Kohler, R. B., White, A. (1980). Thermodissociation of staphylococcal immune complexes and detection of antigen in serum from patients with staphylococcus aureus bacteriaemia. J. Clin. Microbiol. 11, 703-709.

60. Morihara, K., Tsuzuki, H., Tutsushi, O., Inoue, H., Ebata, M. (1965). Pseudomonas aeruginosa elastase. Isolation, crystallization and preliminary characterization. J. Bacteriol. 240, 3295-3303.

Lebenslauf

Am 23.1.1955 wurde ich, Verena Luise Buhl-Meyer geb. Buhl, als Tochter des Sparkassendirektors Fritz Buhl und seiner Ehefrau Anna-Maria in Meßkirch geboren.
Nach Besuch der Volksschule Wechsel auf das Gymnasium in Meßkirch und später auf die Liebfrauenschule in Sigmaringen, wo ich im Juni 1974 das Abitur ablegte. Beginn des Studiums der Zahnmedizin im Wintersemester 1974/75 in Tübingen, Staatsexamen am 18. Juni 1980. Danach assistenzzahnärztliche Tätigkeit bei Herrn Dr. Willer in Reutlingen (November 1980 bis Februar 1982) und bei Herrn Dr. Baumgarten in Sigmaringen (April 1982 bis Dezember 1982). Im Anschluß daran Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Hygiene-Institut der Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. K. Botzenhart. Seit dem 9. Dezember 1983 bin ich mit Dieter Meyer verheiratet.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45